



18 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

12 **Offenlegungsschrift**  
10 **DE 101 49 875 A 1**

51 Int. Cl.7:  
**G 01 N 1/40**  
G 01 N 1/28  
G 01 N 27/00  
C 07 B 63/00  
G 01 N 33/48

21 Aktenzeichen: 101 49 875.6  
22 Anmeldetag: 10. 10. 2001  
43 Offenlegungstag: 3. 7. 2003

DE 101 49 875 A 1

71 Anmelder:

Alpha Technology Gesellschaft für Angewandte  
Biotechnologie mbH i.Ins., 50354 Hürth, DE

72 Erfinder:

Klemm, Manfred, Dr., 50354 Hürth, DE

56 Entgegenhaltungen:

DE	33 37 668 C2
DE	199 52 961 A1
DE	197 00 364 A1
DE	100 06 491 A1
AT	2 97 663
US	58 40 169 A
US	53 40 449 A
US	46 99 706
US	45 52 640
US	45 45 888

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

- 54 Vorrichtung zur Extraktion elektrisch geladener Moleküle  
57 Die vorliegende Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur  
Extraktion elektrisch geladener Moleküle.

DE 101 49 875 A 1

## Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Extraktion elektrisch geladener Moleküle.

[0002] Es besteht in vielen Bereichen der Analytik ein Bedürfnis nach neuen Vorrichtungen und Verfahren, die eine schnelle Analyse kleiner Proben volumina ermöglichen. Beispielfhaft zu nennen sind hier die medizinische Diagnostik, insbesondere die Identifizierung von Krankheitserregern in der Intensivmedizin, die Analyse von Bodenproben auf Kontaminationen, die Lebensmittelüberwachung und die Identifizierung von Keimen in Wasser, insbesondere bei der Überprüfung von Trinkwasser und Reinstwässern in der pharmazeutischen Industrie.

[0003] Die herkömmliche Analytik mittels beispielsweise chromatographischer Verfahren erfordert große Proben volumina und häufig eine aufwendige Vorreinigung des Untersuchungsgutes. Daher läßt sich eine chemische oder biologische Kontamination meist nicht vor Ort nachweisen, z. B. auf der Mülldeponie, in einem möglicherweise von Schimmelpilzen befallenen Haus, direkt am Krankenbett eines Patienten oder in einem Flüchtlingslager, in dem sich eine Seuche auszubreiten droht. Die Proben müssen in ein Labor gebracht, dort untersucht und ausgewertet werden. Es verstreicht wertvolle Zeit, während derer eine Umweltverschmutzung fortschreiten, oder ein Patient im schlimmsten Fall versterben kann, bevor die notwendigen Hilfsmaßnahmen eingeleitet werden können.

[0004] Moderne Analysechips ermöglichen allerdings, auch sehr kleine Mengen eines Analyten präzise zu bestimmen, vorausgesetzt, der Analyt wird mit hinreichender Reinheit auf den Chip aufgebracht. Um diese Reinheit zu gewährleisten, muß auf umständliche Reinigungstechniken zurückgegriffen werden, wie Filtration oder chromatographische Auftrennung. Handelt es sich bei dem Analyten um Proteine oder Nukleinsäuren aus Organismen, müssen diese oftmals in Vorkultur genommen werden, um nach einigen Vermehrungszyklen die nötige Menge des Analyten zu gewinnen.

[0005] Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, eine neue Vorrichtung bereitzustellen, die es ermöglicht, Analyten schnell aus Proben zu extrahieren.

[0006] Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Vorrichtung zur Extraktion elektrisch geladener Moleküle, umfassend

a) Einen ersten Behälter (2), der durch eine Trennstruktur (2.2), die für die zu extrahierenden Moleküle permeabel ist, in zwei Kompartimente unterteilt wird, nämlich in

- i) einen Probenfüllraum (2.1) und
- ii) eine Matrix (2.3),

b) eine in den Probenfüllraum (2.1) hineinragende erste Elektrode (1.1),

c) einen weiteren Behälter (4) zur Aufnahme der extrahierten Moleküle sowie

d) eine weitere Elektrode (4.1), die in elektrischem Kontakt mit dem Inhalt des Behälters (4) steht,

[0007] Die erfindungsgemäße Vorrichtung nutzt den Umstand, daß viele bedeutsame Analyten elektrisch geladene Moleküle sind, die durch Anlegen eines elektrischen Feldes mobilisiert werden und durch eine Filter- oder Trennmatrix geleitet werden können.

[0008] Der Extraktion mittels der erfindungsgemäßen Vorrichtung sind grundsätzlich alle Moleküle zugänglich, die elektrisch geladen sind und eine Filter- oder Trennmatrix passieren können. Entsprechend zugängliche Moleküle sind

beispielsweise elektrisch geladene Makromoleküle, insbesondere Biopolymere wie DNA, RNA, PNA, (als Einzelstränge, Duplexe, Triplex-Strukturen oder Kombinationen hiervon), oder Proteine (z. B. Antikörper, Antigene, Rezeptoren); aber auch Saccharide, Nukleotide, Peptide, und Derivate der kombinatorischen Chemie (z. B. geladene organische Moleküle). Auch Kunststoffe mit polaren Gruppen, wie beispielsweise Polyamine sind der Extraktion mit Hilfe der erfindungsgemäßen Vorrichtung zugänglich. Gleiches gilt für niedermolekulare Verbindungen, wie verschiedene Vitamine, oder chemische Kampfstoffe, z. B. Senfgas, Sarn, Soman, Tabun, oder VX, und auch für Metalle sowie metallorganische Verbindungen wie z. B. Zinn-organische Verbindungen mit z. T. erheblicher Toxizität (CD Römpp Chemie Lexikon - Version 1.0 Stuttgart/New York: Georg Thieme Verlag 1995).

[0009] Die erfindungsgemäße Vorrichtung ist vorzugsweise so ausgeführt, daß die zu extrahierenden Moleküle in einem zwischen den Elektroden (1.1) und (4.1) angelegten elektrischen Feld aus dem Probenfüllraum (2.1) in den Behälter (4) wandern. Hierzu wird gegebenenfalls, beispielsweise bei einer trockenen Probe, eine geeignete Pufferlösung in den Probenfüllraum gegeben und mit der Probe vermischt. Als Pufferlösung sind übliche Elektrophoresepuffer einsetzbar, die dem Fachmann bekannt sind, beispielsweise E-Puffer (40 mM Tris-HCl, 20 mM NaO-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8.3 in Wasser), oder TBE-Puffer (130 mM Tris-HCl, 45 mM Borsäure, 2,5 mM Di-Natrium-EDTA, pH 8,8 in Wasser).

[0010] Diese elektroforcierte Extraktion bewirkt eine rasche Anreicherung des Analyten in dem Behälter (4).

[0011] Die Elektroden (1.1) und (4.1) können aus dem gleichen oder aus unterschiedlichen Materialien bestehen. Geeignete Elektroden-Materialien sind dem Fachmann bekannt und können je nach Art der zu extrahierenden Moleküle variiert werden. Bei der Auswahl der Elektroden-Materialien muß beachtet werden, daß der Analyt, oder der Puffer nicht mit den Elektroden-Materialien reagieren dürfen. Bevorzugte Materialien sind Edelmetalle, wie Gold oder Platin, aber auch unedle Metalle wie Kupfer, Silber, oder Chrom bzw. metallische Legierungen wie Stahl, oder auch Silizium und Siliziumverbindungen.

[0012] Die Trennstruktur (2.2) dient dem Zweck, grobe Verunreinigungen aus der Probe zurückzuhalten. Der Fachmann kann hierzu jede geeignete Sieb- oder Grobfilterstruktur einsetzen, beispielsweise ein Sieb, einen Filter oder eine Fritte. Besonders geeignete Trennstrukturen sind beispielsweise Stahl- oder Edelmetallsiebe, wie auch Fritten aus Keramik oder gesintertem Glasgranulat.

[0013] Vorzugsweise ist die erfindungsgemäße Vorrichtung dadurch gekennzeichnet, daß die weitere Elektrode (4.1) durch eine feinporöse Schutzschicht (4.2) von den extrahierten Molekülen in dem Behälter (4) getrennt ist. Diese Schutzschicht verhindert, daß die Moleküle des Analyten in direkten Kontakt mit der Elektrode (4.1) kommen und dadurch möglicherweise elektrochemisch verändert werden. Die Art der eingesetzten feinporösen Schutzschicht kann durch den Fachmann variiert werden. Geeignete Schutzschichten (4.2) sind beispielsweise Zellulosemembranen. In Abhängigkeit von den zu extrahierenden Analyten kann eine Membran mit geeigneter Porengröße gewählt werden.

[0014] Für die elektroforcierte Extraktion von Proteinen oder Nukleinsäuren, insbesondere von DNA, RNA, oder PNA, vorzugsweise von DNA, eignen sich besonders Dialyseschläuche (bzw. Stücke davon) aus Zellulose oder benzoylierter Zellulose, die Moleküle oberhalb eines MWCO (Molecular Weight Cut Off) von 1.200 bis 12.000 zurückhalten können. Solche Schläuche sind beispielsweise von der

Firma Sigma-Aldrich (Deisenhofen) unter der Bezeichnung "Dialysis sacks" Katalog "Biochemikalien + Reagenzien 2000/2001", Katalognummer: 250-7U bzw. 250-9U, erhältlich. Gleichfalls geeignet sind Filter auf Zellulosebasis, die Moleküle oberhalb eines MWCO (Molecular Weight Cut Off) von 5.000 bis 100.000 zurückhalten können. Solche Filter sind beispielsweise von der Firma Carl Roth GmbH (Karlsruhe) unter der Bezeichnung ZelluTrans (regenerierte Zellulose, Filterbereiche MWCO 4000 bis 6000, 8000 bis 10000, 12000 bis 14000, 25000), Spectra/Por (Zelluloseester, Filterbereich von MWCO 100 bis zu MWCO 300.000); oder Nadir (Zellulosehydrat, MWCO 10.000 bis 20.000, mittlere Porengröße 25–30 Angstrom) erhältlich. Besonders bevorzugt für die elektroforcierte Extraktion von Proteinen oder Nukleinsäuren, insbesondere von DNA, RNA, oder PNA, vorzugsweise von DNA sind die ZelluTrans-Filter der Firma Carl Roth GmbH (Karlsruhe) mit einem MWCO von 8.000 bis 10.000 oder 12.000 bis 14.000 sowie die Dialyseschlauhe, die von der Firma Sigma-Aldrich (Deisenhofen) unter der Bezeichnung "Dialysis sacks" Katalog "Biochemikalien + Reagenzien 2000/2001", Katalognummer: 250-7U bzw. 250-9U, erhältlich sind.

[0015] Die erfindungsgemäße Vorrichtung kann zusätzlich eine auf den Behälter (2) aufsteckbare oder aufschraubbare Kappe (1) aufweisen, an oder in der die erste Elektrode (1.1) befestigt ist. Die Kappe kann ihrerseits ein Septum (1.2) aufweisen, dass oft aus Silikon oder Gummi hergestellt wird und sowohl als Überdruckventil, als auch zum sterilen Befüllen des Probenfüllraumes (2.1) Verwendung finden kann.

[0016] Vorzugsweise ist der Behälter (4) reversibel an dem Behälter (2) befestigt, insbesondere aufgesteckt oder aufgeschraubt, besonders bevorzugt mittels eines Adapters (3), ganz besonders bevorzugt mittels eines LuerLock-Adapters.

[0017] Die Kappe (1), der Behälter (2), der Adapter (3) und der Behälter (4) können aus demgleichen Material oder aus unterschiedlichen Materialien bestehen. Geeignete Materialien sind dem Fachmann bekannt und können je nach Art der zu extrahierenden Moleküle variiert werden. Bei der Auswahl der Materialien muß beachtet werden, daß der Analyt, oder der Puffer nicht mit den Materialien reagieren dürfen. Außerdem dürfen die eingesetzten Materialien nicht leitfähig sein. Bevorzugte Materialien sind Kunststoffe, Glas, Keramik, Porzellan und auch entsprechend beschichtete Metalle oder metallische Werkstoffe, z. B. Stahl mit Kunststoff-Innenbeschichtung.

[0018] Die Matrix (2.3) ist vorzugsweise homogen, d. h. sie besteht durchgehend aus einem Material. Sie kann aber auch heterogen aufgebaut sein, beispielsweise in Schichten aus verschiedenen Materialien. Geeignete Matrix-Materialien sind alle üblichen in der Chromatographie oder Elektrophorese eingesetzten Trennmateriale, die durch den Fachmann in Abhängigkeit von den zu extrahierenden Analyten ausgewählt werden. Bevorzugte Matrix-Materialien für die elektroforcierte Extraktion von Proteinen oder Nukleinsäuren, insbesondere von DNA, RNA, oder PNA, vorzugsweise von DNA sind ausgewählt unter:

a) Gelfiltrations-Matrices, insbesondere unter Agarose-Gelen, Dextran-Gelen, oder gemischten Agarose-Dextran-Gelen, vorzugsweise unter den als Sephadex-, Sephacryl-, PDX-, Sepharose-, Sepharose CL-, Superdex-, Superose- oder Toyopearl HW-Gel bekannten Matrices.

b) Ionenaustausch-Matrices, insbesondere unter solchen auf der Basis von Dextran, Agarose, Cellulose oder Polystyrene, vorzugsweise unter solchen mit

i) Anionenaustauschern, die ausgewählt sind unter folgenden Gruppen: Diethylaminoethyl-, "Q" = Trimethylaminoethyl- und "QAE" = Hydroxypropyldiethylaminoethyl

ii) Kationenaustauschern, die ausgewählt sind unter folgenden Gruppen: Carboxymethyl-, Sulfomethyl- und Sulfopropyl

c) Polyacrylamid-Elektrophorese-Gelen

d) Agarose-Elektrophorese-Gelen

[0019] Besonders bevorzugte Matrix-Materialien für die elektroforcierte Extraktion von Proteinen oder Nukleinsäuren, insbesondere von DNA, RNA, oder PNA, vorzugsweise von DNA sind ausgewählt unter:

e) Gelfiltrations-Matrices mit einem Trennbereich von 0,7 bis  $400 \times 10^5$  MW, insbesondere unter den als Sepharose 2B oder Sepharose 2B Cross-linked bekannten Matrices, mit einem wet bead diameter von 60 bis 200 µm (erhältlich von Sigma, Deisenhofen, "Biochemikalien + Reagenzien 2000/2001", Cat-No: 2B-300 bzw. CL-2B-300).

f) Gelfiltrations-Matrices mit einem Trennbereich von 0,5 bis  $50 \times 10^6$  MW, insbesondere unter den als Toyopearl HW-75F bekannten Matrices mit einem dry bead diameter von 30 bis 60 µm (erhältlich von Sigma, Deisenhofen, "Biochemikalien + Reagenzien 2000/2001", Cat-No: 8-07469).

g) Ionenaustausch-Matrices, insbesondere unter solchen auf der Basis von Agarose mit starken Kationenaustauschern, vorzugsweise unter den als SP-Sepharose bekannten Matrices mit einer wet bead size von 45 bis 165 µm (erhältlich von Sigma, Deisenhofen, "Biochemikalien + Reagenzien 2000/2001", Cat-No: S. 1799 ff).

h) Polyacrylamid-Elektrophorese-Gelen mit einer Konzentration von 2 bis 30 Gew-% Polyacrylamid, vorzugsweise 2 bis 10 Gew-% Polyacrylamid.

i) Agarose-Elektrophorese-Gelen mit einer Konzentration von 0,2 bis 4 Gew-% Agarose, vorzugsweise 0,3 bis 0,8 Gew-% Agarose.

[0020] Vorzugsweise erstreckt sich die Matrix (2.3) in den Behälter (4). In diesem Fall sind die Materialien der Matrices (2.3) und (4.3) identisch. Die Matrices können jedoch auch voneinander verschieden sein. Es kann auch eine leitende Verbindung durch den verwendeten Elektrophoresepuffer bestehen, wenn sich die Matrix (2.3) nicht in den Behälter (4) erstreckt. Die Matrix (4.3) kann daher auch vollständig fehlen und beispielsweise durch Pufferlösung ersetzt sein.

[0021] Die mittels der erfindungsgemäßen Vorrichtung extrahierten Analyten können aufgrund ihrer Reinheit und hohen Konzentration direkt in oder auf eine geeignete Analysevorrichtung ein- oder aufgebracht werden, beispielsweise auf einen Analysechip, oder in einen tragbaren Gaschromatographen.

[0022] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Extraktion elektrisch geladener Moleküle unter Einsatz einer erfindungsgemäßen Vorrichtung, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Probe in den Probenführraum (2.1) des Behälters (2) einbringt, gegebenenfalls einen geeigneten Puffer zugibt, zwischen den Elektroden (1.1) und (4.1) ein elektrisches Feld erzeugt und die Moleküle so in dem Behälter (4) konzentriert.

[0023] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung zur Extraktion elektrisch geladener Moleküle, die ausgewählt sind

unter

j) elektrisch geladenen Makromolekülen, insbesondere

- i) Biopolymeren wie DNA, RNA, PNA, (als Einzelstränge, Duplexe, Triplex-Strukturen oder Kombinationen hiervon), oder Proteinen (z. B. Antikörper, Antigene, Rezeptoren);
- ii) Kunststoffen mit polaren Gruppen, wie beispielsweise Polyamine,
- k) niedermolekularen Verbindungen, wie Saccharide, Nukleotide, Peptide, und Derivate der kombinatorischen Chemie (z. B. geladene organische Moleküle), Vitamine, oder chemische Kampfstoffe, z. B. Senfgas, Sarm, Soman, Tabun, oder VX,
- l) Metallen sowie metallorganischen Verbindungen wie z. B. Zinnorganischen Verbindungen

aus Proben, insbesondere aus Staub-, Luft-, Boden-, Wasser-, Lebensmittel-, oder medizinischen Proben, vorzugsweise aus Proben, die ausgewählt sind unter Blut-, Serum-, Sputum-, Sperma-, Liquor, Stuhl-, oder Urinproben sowie aus Proben von Trachealsekret, Bronchiallavage, Bronchoalveolärlavage.

[0024] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung einer erfindungsgemäßen Vorrichtung auf dem Gebiet des Umweltschutzes, der Toxikologie, der Diagnostik bei Menschen, Pflanzen oder Tieren, der Lebensmittel- und Trinkwasseruntersuchung, der Qualitätskontrolle von Rohstoffen, Zwischenprodukten und Endprodukten der pharmazeutischen, kosmetischen und der Lebensmittelindustrie sowie der Abwehr terroristischer Angriffe mit biologischen oder chemischen Kampfmitteln.

#### Liste der Bezugszeichen

- 1 Kappe
- 1.1 erste Elektrode mit Kontakt
- 1.2 Septum
- 2 erster Behälter
- 2.1 Probenfüllraum
- 2.2 Trennstruktur
- 2.3 Matrix
- 3 Adapter
- 4 weiterer Behälter
- 4.1 weitere Elektrode mit Kontaktpunkt
- 4.2 feinporöse Schutzschicht
- 4.3 Matrix

[0025] Die Figuren (Zeichnungen) verdeutlichen die Erfindung, ohne sie jedoch darauf einzuschränken:

[0026] Fig. 1 zeigt eine mögliche Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung.

[0027] Fig. 2 zeigt in einer detaillierten Ausschnittsvergrößerung aus Fig. 1 den Behälter (4).

#### Patentansprüche

1. Vorrichtung zur Extraktion elektrisch geladener Moleküle, umfassend
  - a) Einen ersten Behälter (2), der durch eine Trennstruktur (2.2), die für die zu extrahierenden Moleküle permeabel ist, in zwei Kompartimente unterteilt wird, nämlich in
    - i) einen Probenfüllraum (2.1) und
    - ii) eine Matrix (2.3),
  - b) eine in den Probenfüllraum (2.1) hineinragende erste Elektrode (1.1),

c) einen weiteren Behälter (4) zur Aufnahme der extrahierten Moleküle sowie

d) eine weitere Elektrode (4.1), die in elektrischem Kontakt mit dem Inhalt des Behälters (4) steht.

2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die weitere Elektrode (4.1) durch eine feinporöse Schutzschicht (4.2) von den extrahierten Molekülen in dem Behälter (4) getrennt ist.

3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß sie zusätzlich eine auf den Behälter (2) aufsteckbare oder aufschraubbare Kappe (1) aufweist, an oder in der die erste Elektrode (1.1) befestigt ist.

4. Vorrichtung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Kappe ein Septum (1.2) aufweist.

5. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Behälter (4) reversibel an dem Behälter (2) befestigt ist, vorzugsweise aufgesteckt oder aufgeschraubt, besonders bevorzugt mittels eines Adapters (3), ganz besonders bevorzugt eines LuerLock-Adapters.

6. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Matrix (2.3) aus einem Material besteht, das ausgewählt ist unter:

a) Gelfiltrations-Matrices, insbesondere unter Agarose-Gelen, Dextran-Gelen, oder gemischten Agarose-Dextran-Gelen, vorzugsweise unter den als Sephadex-, Sephacryl-, PDX-, Sepharose-, Sepharose CL-, Superdex-, Superose- oder Toyopearl HW-Gel bekannten Matrices.

b) Ionenaustausch-Matrices, insbesondere unter solchen auf der Basis von Dextran, Agarose, Cellulose oder Polystyrene, vorzugsweise unter solchen mit

- i) Anionenaustauschern, die ausgewählt sind unter folgenden Gruppen: Diethylaminoethyl-, "Q" = Trimethylaminoethyl- oder "QAE" = Hydroxypropyldiethylaminoethyl
- ii) Kationenaustauschern, die ausgewählt sind unter folgenden Gruppen: Carboxymethyl-, Sulfomethyl- und Sulfopropyl

c) Polyacrylamid-Elektrophorese-Gelen

d) Agarose-Elektrophorese-Gelen

7. Vorrichtung nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Matrix (2.3) aus einem Material besteht, das ausgewählt ist unter:

a) Gelfiltrations-Matrices mit einem Trennbereich von 0,7 bis  $400 \times 10^5$  MW, insbesondere unter den als Sepharose 2B oder Sepharose 2B Cross-linked bekannten Matrices, mit einem wet bead diameter von 60 bis 200  $\mu$ m

b) Gelfiltrations-Matrices mit einem Trennbereich von 0,5 bis  $50 \times 10^6$  MW, insbesondere unter den als Toyopearl HW-75F bekannten Matrices mit einem dry bead diameter von 30 bis 60  $\mu$ m

c) Ionenaustausch-Matrices, insbesondere unter solchen auf der Basis von Agarose mit starken Kationenaustauschern, vorzugsweise unter den als SP-Sepharose bekannten Matrices mit einer wet bead size von 45 bis 165  $\mu$ m.

d) Polyacrylamid-Elektrophorese-Gelen mit einer Konzentration von 2 bis 30 Gew.-% Polyacrylamid, vorzugsweise 2 bis 10 Gew.-% Polyacrylamid.

e) Agarose-Elektrophorese-Gelen mit einer Konzentration von 0,2 bis 4 Gew.-% Agarose, vorzugsweise 0,3 bis 0,8 Gew.-% Agarose.

8. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Materialien der Matrices (2.3) und (4.3) identisch sind.

9. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die zu extrahierenden elektrisch geladenen Moleküle ausgewählt sind unter

a) elektrisch geladenen Makromolekülen, insbesondere

i) Biopolymeren wie DNA, RNA, PNA, (als Einzelstränge, Duplexe, Triplex-Strukturen oder Kombinationen hiervon), oder Proteinen (z. B. Antikörper, Antigene, Rezeptoren);

ii) Kunststoffen mit polaren Gruppen, wie beispielsweise Polyamine,

b) niedermolekularen Verbindungen, wie Saccharide, Nukleotide, Peptide, und Derivate der kombinatorischen Chemie (z. B. geladene organische Moleküle), Vitamine, oder chemische Kampfstoffe, z. B. Senfgas, Sarn, Soman, Tabun, oder VX,

c) Metallen sowie metallorganischen Verbindungen wie z. B. Zinnorganischen Verbindungen.

10. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Extraktion aus Proben erfolgt, insbesondere aus Proben, die ausgewählt sind unter Staub-, Luft-, Boden-, Wasser-, Lebensmittel-, oder medizinischen Proben, vorzugsweise aus Proben, die ausgewählt sind unter Blut-, Serum-, Sputum-, Sperma-, Liquor, Stuhl-, oder Urinproben sowie aus Proben von Trachealsekret, Bronchiallavage, oder Bronchoalveolärelavage.

11. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Elektroden (1.1) und (4.1) gleich oder verschieden sind und aus Materialien bestehen, die ausgewählt sind unter Edelmetallen, wie Gold oder Platin, aber auch unedlen Metallen wie Kupfer, Silber, oder Chrom bzw. metallischen Legierungen wie Stahl, oder auch Silizium und Siliziumverbindungen.

12. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Trennstruktur (2.2) ausgewählt ist unter Sieb- oder Grobfilterstrukturen, insbesondere Sieben, Filtern oder Fritten, vorzugsweise Stahl- oder Edelmetallsieben, oder Fritten aus Keramik oder gesinterten Glasperlen.

13. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die feinporöse Schutzschicht (4.2) eine Zellulosemembran ist.

14. Verfahren zur Extraktion elektrisch geladener Moleküle unter Einsatz einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Probe in den Probenfüllraum (2.1) des Behälters (2) einbringt, gegebenenfalls einen geeigneten Puffer zugibt, zwischen den Elektroden (1.1) und (4.1) ein elektrisches Feld erzeugt und die Moleküle so in dem Behälter (4) konzentriert.

15. Verwendung einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Extraktion elektrisch geladener Moleküle, die ausgewählt sind unter

a) elektrisch geladenen Makromolekülen, insbesondere

i) Biopolymeren wie DNA, RNA, PNA, (als Einzelstränge, Duplexe, Triplex-Strukturen oder Kombinationen hiervon), oder Proteinen (z. B. Antikörper, Antigene, Rezeptoren);

ii) Kunststoffen mit polaren Gruppen, wie beispielsweise Polyamine,

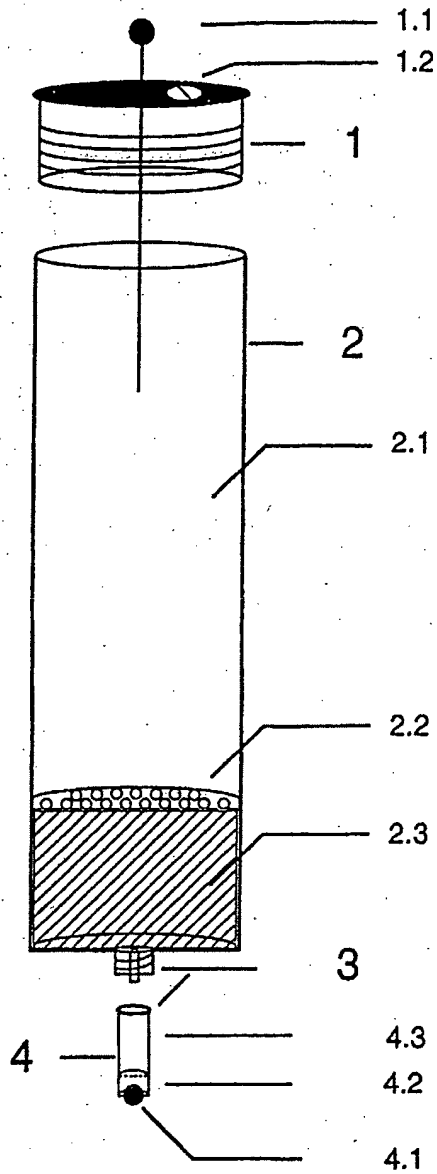
b) niedermolekularen Verbindungen, wie Saccharide, Nukleotide, Peptide, und Derivate der kombinatorischen Chemie (z. B. geladene organische Moleküle), Vitamine, oder chemische Kampfstoffe, z. B. Senfgas, Sarn, Soman, Tabun, oder VX,

c) Metallen sowie metallorganischen Verbindungen wie z. B. Zinnorganischen Verbindungen.

aus Proben, insbesondere aus Staub-, Luft-, Boden-, Wasser-, Lebensmittel-, oder medizinischen Proben, vorzugsweise aus Proben, die ausgewählt sind unter Blut-, Serum-, Sputum-, Sperma-, Liquor, Stuhl-, oder Urinproben sowie aus Proben von Trachealsekret, Bronchiallavage, oder Bronchoalveolärelavage.

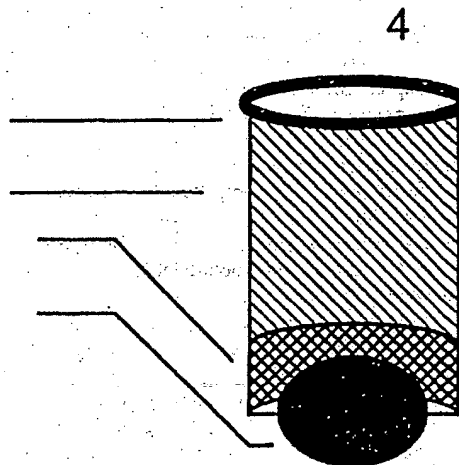
16. Verwendung einer einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 13 auf dem Gebiet des Umweltschutzes, der Toxikologie, der Diagnostik bei Menschen, Pflanzen oder Tieren, der Lebensmittel- und Trinkwasseruntersuchung, der Qualitätskontrolle von Rohstoffen, Zwischenprodukten und Endprodukten der pharmazeutischen, kosmetischen und der Lebensmittelindustrie sowie der Abwehr terroristischer Angriffe mit biologischen oder chemischen Kampfmitteln.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen



Figur 1

Figur 2



**PCT**  
**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference <b>KKSS:205407577</b>	<b>FOR FURTHER ACTION</b>	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
International application No. <b>PCT/AU2004/001367</b>	International filing date ( <i>day/month/year</i> ) <b>7 October 2004</b>	(Earliest) Priority Date ( <i>day/month/year</i> ) <b>7 October 2003</b>
Applicant <b>UNIVERSITY OF NEWCASTLE et al</b>		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of **3** sheets.



It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

**Basis of the report**

- a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.
- ☐ The international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).
- b. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.
2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box No. II).
3. ☐ Unity of invention is lacking (See Box No. III).
4. With regard to the title,
- ☐ the text is approved as submitted by the applicant.
- ☒ the text has been established by this Authority to read as follows:
- Sperm cell separation by electrophoresis**
5. With regard to the abstract,
- ☒ the text is approved as submitted by the applicant.
- ☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.
6. With regard to the drawings,
- a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No.
- ☐ as suggested by the applicant.
- ☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.
- ☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.
- b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract.

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl. <sup>7</sup>: C12N 5/00, B01D 57/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

SEE ELECTRONIC DATABASE BOX BELOW

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

SEE ELECTRONIC DATABASE BOX BELOW

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPIDS, CAPLUS, MEDLINE, BIOSIS: Keywords: sperm, semen, electrophoresis, electric potential, membrane, barrier, permeable, polycarbonate, separate, sort?, purif?, select?

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2002/024314, A (The Texas A & M University System et al.) 28 March 2002. See whole document.	
A	WO 2002/093168, A (Gradipore Ltd) 21 November 2002. See whole document.	
A	DE 10149875, A (Alpha Technology Gesellschaft für Angewandte Biotechnologie mbH i.Ins.) 3 July 2003. See whole document.	



Further documents are listed in the continuation of Box C



See patent family annex

## Special categories of cited documents:

"T"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"	document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search  
9 November 2004Date of mailing of the international search report  
19 NOV 2004Name and mailing address of the ISA/AU  
AUSTRALIAN PATENT OFFICE  
PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA  
E-mail address: pct@ipaustalia.gov.au  
Facsimile No. (02) 6285 3929Authorized officer  
  
JANE MCHENRY  
Telephone No : (02) 6283 2091



This Annex lists the known "A" publication level patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document Cited in Search Report		Patent Family Member			
WO	2002/024314	AU	91491/01	CA	2421450
		US	2002043465	EP	1333910
WO	2002/093168	US	2003000836		
DE	10149875				
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.					
END OF ANNEX					

POWERED BY **Dialog**

**Device for extracting electrically charged molecules, useful e.g. in environmental monitoring or clinical diagnosis, comprises electrodes, containers and a matrix permeable to analyte**

**Patent Assignee:** ALPHA TECHNOLOGY GES ANGEWANDTE BIOTECHN

**Inventors:** KLEMM M

#### Patent Family

Patent Number	Kind	Date	Application Number	Kind	Date	Week	Type
DE 10149875	A1	20030703	DE 1049875	A	20011010	200354	B

**Priority Applications (Number Kind Date):** DE 1049875 A ( 20011010)

#### Patent Details

Patent	Kind	Language	Page	Main IPC	Filing Notes
DE 10149875	A1		6	G01N-001/40	

#### Abstract:

DE 10149875 A1

NOVELTY Device for extracting electrically charged molecules (A) comprising:

- (a) a container (2) divided, by a separator (2.2) permeable to (A), into a sample filling space (2.1) and matrix (2.3);
- (b) an electrode (2.1) that extends into (2);
- (c) a second container (4) for extracted (A); and
- (d) a second electrode (4.1) in contact with the contents of (4).

DETAILED DESCRIPTION An INDEPENDENT CLAIM is also included for a method for extracting (A) using the new device.

USE The device is used to concentrate charged molecules e.g. biopolymers, specifically DNA, RNA or peptide nucleic acid (single, double or triple strands) or proteins (antibodies, antigens or receptors), plastics with polar groups (e.g. polyamines), low molecular weight compounds (sugars, nucleotides, peptides), combinatorial chemicals, vitamins, chemical warfare agents, e.g. mustard gas or sarin, or organometallic, e.g. organotin, compounds, before analysis (claimed), e.g. for environmental protection, toxicology, diagnosis (in humans, animals or plants), food and water analysis, quality control of raw, intermediate or final products in the pharmaceutical, cosmetics and food industries, also to detect terrorist attacks with biological or chemical warfare agents.

ADVANTAGE (A) are concentrated in high purity and at high concentration, allowing them to be

determined directly, e.g. on a chip or in a portable gas chromatograph.

pp; 6 DwgNo 1/2

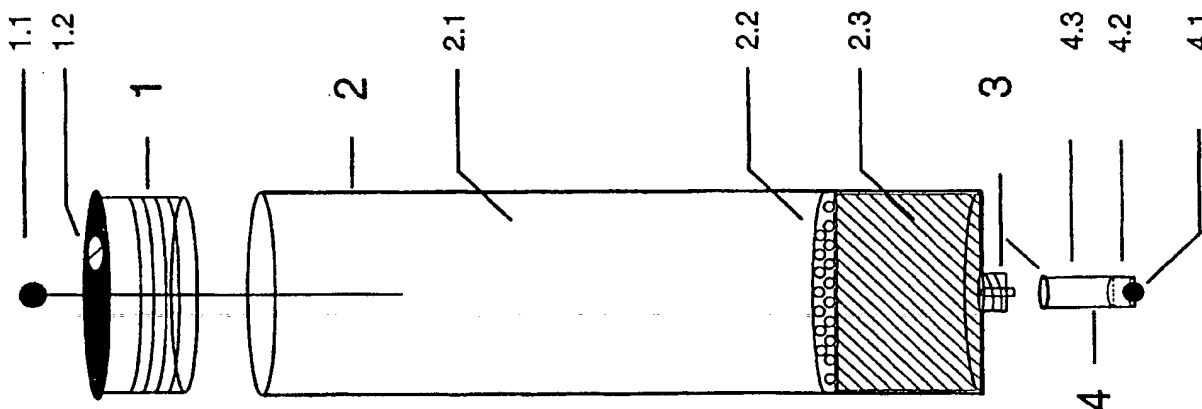
### Technology Focus:

TECHNOLOGY FOCUS - INSTRUMENTATION AND TESTING - Preferred Device: Electrode (4.1) is protected from the contents of (4) by a fine-pored protective layer, particularly of cellulose, and container (2) may be fitted with a cap, particularly a septum, on, or in, which electrode (2.1) is fixed. (4) is reversibly attached to (2), especially using a Leur-lock adaptor. The electrodes are made of (non-) noble metal, e.g. gold or copper, alloy, e.g. stainless steel, silicon or silicon compounds. Separator (2.2) is a sieve or coarse filter, e.g. a metal screen, ceramic frit or sintered glass beads.

Preferred Matrix: This is a gel-filtration or ion-exchange material or an electrophoretic gel, and a similar material may be present in (4).

Preferred Method: A sample (e.g. dust, air, soil, water, body fluid or other clinical sample) is placed in (2), optionally together with a buffer, e.g. a standard electrophoresis buffer, then an electrical field applied so that (A) become concentrated in (4).

POLYMERS - Preferred Matrix: The Gel filtration materials are agarose and/or dextran, especially with a separation range 0.07-40 MD, specifically Sepharose 2B, optionally crosslinked, with wet bead diameter 60-200 microns, or separation range 0.5-50 MD, especially Toyopearl HW-75F with dry bead diameter 30-60 microns. Ion-exchange materials are based on dextran, agarose, cellulose or polystyrene, particularly with dimethylaminoethyl, trimethylaminoethyl or hydroxypropyldiethylaminoethyl, carboxymethyl, sulfomethyl or sulfopropyl functional groups, especially SP-Sepharose with wet bead diameter 45-165 microns. Electrophoretic gels are based on polyacrylamide (2-30, preferably 2-10, wt. %) or agarose (0.2-4, preferably 0.3-0.8, wt. %).



Derwent World Patents Index

© 2006 Derwent Information Ltd. All rights reserved.

Dialog® File Number 351 Accession Number 15508313